

# 直流による蛋白質疎水結合の回復

井村 洋一・鷲塚 靖

本文の要旨は、第4回日本生物物理学会学術講演会(1965)\*、および同第5回講演会(1966)\*\*に発表したものである。

## 1. ま え が き

生物個体を1個の熱力学的閉鎖系とみなすならば、その老化現象ないし寿命の存在に対して、エントロピー増大の第2法則が何らかの形で介在することが考えられる。すなわち微視的範囲で連続的に起る一定の微小変化も巨視的には相の転換をもたらさうといういわゆる微視系熱力学現象が、この場合は恒温、恒圧、一定 pH 下で起きていることが考えられる。

生命体が熱力学的閉鎖系か開放系かということはしばしば論じられるところであり、たしかに生命体には「マクセルのデモン」が本質的には内在しているかもしれないが、ここでは一応最終の視点を我々多細胞動物個体の生態に向けて、これが1個の閉鎖系であるという常識の上に立って推理をすすめることにする。

たまたま滷紙電気泳動法において両性電解質であるアミノ酸の分画が直流によって収縮する現象を認め、もし生命体の本質が蛋白質の両性電解性を構成する陰陽固定イオンに依存すると仮定するならば、この現象は生命体の老化現象に対する熱力学的な逆操作の可能性を示唆するものではないかと考え、以下に述べるような推察および実験を試みた。

## 2. 蛋白質の両性電解性と生命体

生命体が核、膜、酵素を通じて総て蛋白質と称される高分子に依存することはいうまでもないが、さらにその最終段階の低分子であるアミノ酸や生物エネルギーの媒介物質である ATP まで敷衍して考察を試みると、これらがみな一様に各分子内に陰陽の固定イオン基を有ついわゆる両性電解質であることに気付くのである。

しかして各種蛋白質の2次3次と折りたたまれた高次構造内には多数の固定イオンが密集して配列されていることや、生物細胞内の原形質が動植物を問わずすべて一様に約30%程度の高濃度蛋白水溶液からなっていることを考えるならば、生命の機能が密度の高い陰陽固定イオンの場というあたかも配位子場にも似た量子力学的な特殊な場の中、あるいはまた高分子の表面荷電が互に打消

し合っているような特殊なふんい気の中で営まれているであろうことが推察される。

一般にイオン濃度の高い水溶液中では遊離基が発生しやすいと言われているが、水溶液における無機的な触媒作用と酵素の示す桁ちがいに速い触媒作用を比較してみると、その原因の1つが酵素蛋白の陰陽固定イオンにあるのではないかと推察される。いま1例をCu錯化合物の $H_2O_2$ 分解速度にとるならば、その分解速度が $H_2O_2$ 水溶液内のNaCl濃度が増加するに従って増加する<sup>1)</sup>ことは、各種カタラーゼの活性中心である金属イオンとその担体である蛋白質の固定イオンとの関係を示唆するものであらうと考えられる。すなわち酵素蛋白中においては、帯電毛管内におけるごとくその内部の固定イオンが活性中心を取巻いて遊離イオンの静電作用とは異なる強い静電場を作っている<sup>2)</sup>のであらう。

生体膜の機能については動的な面と静的な面があるわけであるが、生体膜になぞらえて作られた人工の両性イオン交換膜に関して、そのイオン撰択透過性は膜の陰陽固定イオンの種類によるのではなく陰陽交換基の数の比によって変化し、とくに両交換基が等量にある膜では特殊な透過性を示すことが報じられている。すなわち膜の静的な機能の面も抽象的な固定イオンに依存すると考えられる立場があるわけである。<sup>3)</sup>

このほか生物体の細胞液の pH が強い緩衝力を有することも生命機能の重要な一つの要素であるが、これもまた蛋白質の両性電解性に依存するところが大きいとされている。

以上述べたところから生命体の本質が各種蛋白質の両性電解性を構成する陰陽の固定イオンにあるとの仮定は一応妥当な推理であらうと考える。

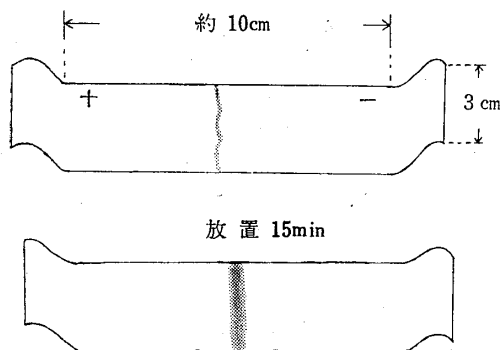
## 3. 滷紙電気泳動法におけるアミノ酸分画の収縮現象

たまたま滷紙電気泳動法によるアミノ酸の分離を検討中、使用する電解液の pH が試料アミノ酸の等電点に近づいたとき、そのアミノ酸の分画が図のごとく直流によって収縮することを認めた。

\*第4回日本生物物理学会講演予稿集33頁

\*\*第5回全上79頁

図 直流による滷紙上のアミノ酸分画の収縮現象  
 直流：200~300V, 15min, 1~4 mA



電解液：PH=3.4 (グルタミン酸等電点) の0.1M PO<sub>4</sub>Buffまたは1%Na-Ace.Ac.Buff  
 使用アミノ酸：0.1%グルタミン酸ソーダを全上電解液に溶解したもの  
 滷紙：東洋滷紙No.51  
 電極：白金電極を直接挿入  
 発色試薬：0.25% ニンヒドリン，水—ブタノール溶液，70°Cで発色

この現象はすべてのアミノ酸について再現が可能であり，またゼラチンのような両性電解質高分子についても同じように認められた。

以上の操作は滷紙上に吸着された分子の表面荷電の問題を考慮しなければならないのではないかという疑問を残してはいるが，ともかく両端の電圧を高くするほど強く現われ，また使用する電解液のイオン濃度を小さくするほど明瞭に現われる。電解液のイオン濃度が収縮現象におよぼす逆効果は前節でふれたごとく，固定イオンと遊離イオンの静電作用の拮抗的な効果にもとづくものと考えられる。

#### 4. 直流によるゼラチン水溶液の粘度低下

前節に述べたごとく直流による滷紙上のアミノ酸分画の収縮現象からただちに推察されることは，分子内に多数の陰陽固定イオンを有する蛋白質分子を直流の場においたときは分子それ自体が収縮を起すであろうということである。

この場合本現象は，本質的に静電的なものであるから，蛋白質の収縮，弛緩すなわちエントロピーの増減は介在する水のポテンシャルの増減と相殺することになる。

もちろん10V/cmの直流電圧は数Å 程度の間隔を距てて相隣るNH<sub>2</sub><sup>+</sup>基とCO<sup>-</sup>基に対しては calに換算し

て僅かに約10<sup>-4</sup>Kcal/モルの結合力をおよぼすに過ぎないが，蛋白質高分子内の多数の陰陽固定イオン基に重複して加圧される場合には充分有意の収縮現象が現われることは期待できる。

表1 直流によるゼラチン水溶液の粘度低下

10%ゼラチン調整直後の比粘度	A 186, B 112
全上 直流処理後の比粘度	A 179, B 115

10%ゼラチン調整2日目の比粘度	A 236, B 142
全上 直流処理後の比粘度	A 158, B 110

表1は直径0.6cm，長さ20cmのU字管に10%ゼラチン水溶液を入れて直接白金電極を挿入し，30min約250Vの直流を通じた場合に起きる同液の粘度低下をオストワルドの粘度計を用いて測定したものである。10%ゼラチンは重湯煎上で過熱しないように注意しつつ溶解し，直ちに冷水で室温まで冷却し，その5ccを採取して全しく室温で粘度測定を行なった。

通電後両極附近ではかなりのpH変化を認めるが，液全体をとりだしたときのpH変化は微小であって粘度に影響をおよぼすほどのものではなかった。また通じる電流も僅か数mA程度であるから蛋白質の分解も問題にはならない。

ゼラチン水溶液の粘度は調整直後より次第に増加し数時間後に一定値に達するのであるが，直流による粘度の低下効果は調整直後では極めて小さいかまたはほとんど皆無であり，一定値に達した場合において著しく現われる。

表中のAとBは2種類の異なる局方ゼラチンについての測定値であり，蛋白分子のような高分子水溶液の粘度を測定する場合にオストワルドの粘度計を使用することは単に一応の目安をつけるにすぎないが，測定値のしめす粘度低下は蛋白分子が収縮していることを定性的に証明したものと考える。

#### 5. 高濃度ゼラチン水溶液中のアミラーゼ活性

いま市販のα-アミラーゼ0.02%水溶液に局方ゼラチンを0, 2, 5, 10, 15%になるように添加された混合液の力価を測定すると表2のようになる。すなわちアミラーゼの力価はゼラチン濃度の増加にしたがって低下してくる。

表2 ゼラチン濃度の増加による0.02%  $\alpha$ -アミラーゼの力価低下

ゼラチン濃度 %	0	2	5	10	15
アミラーゼ 力価	100	89	82	77	76

この活性低下は極めて速かに起り、ゼラチンを添加した直後にはすでにほぼ完了しているようである。また一方0.02%アミラーゼ、10%ゼラチンの混合液を5倍に水で希釈して24時間室温に放置したものと、測定直前に5倍に希釈したの者とを比較してみると両者の力価に少しも差を認めず、いずれも原液と比較して高い活性を示すことから、希釈する場合のアミラーゼ力価の回復も非常に速かであることが認められる。

この現象は8M尿素によるタカアミラーゼの活性低下がかなり長時間を要することや、またこれを希釈する場合のアミラーゼの活性回復が極めて困難である<sup>4)</sup>ことと対照的であって、その理由は高濃度ゼラチン中の場合は酵素分子内に水素結合の切断のごとき破壊が生じていないことと、2節で述べたごとく高濃度蛋白溶液中では酵素蛋白がその表面荷電を喪失していると考えられるのも一つの重大な原因ではないかと考えられる。

表3のAは1.2%でんぶん溶液に対する $\alpha$ -アミラーゼ0.02%単純水溶液と $\alpha$ -アミラーゼ0.02%、ゼラチン10%の混合水溶液との分解速度を比較検討したものであり、同表Bは前液の1/2の濃度である0.6%でんぶん溶液に対する同じく両液の分解速度である。〔註. いずれも分解温度は40°C〕

表3のA 1.2%でんぶん溶液に対する0.02% $\alpha$ -アミラーゼ単純液と0.02% $\alpha$ -アミラーゼ、10%ゼラチン混合液の分解速度の比較

分解時間 min	単純液の分解速度定数 $k \times 10^{-3}/\text{min}$	混合液の分解速度定数 $k \times 10^{-3}/\text{min}$		
0	—	—	—	—
20	4.6	2.1	ここを初濃度とすれば	—
40	4.5	3.9	5.7	ここを初濃度とすれば
60	4.7	4.2	5.3	4.8

表3のB 0.6%でんぶん溶液に対する、全上両液の分解速度の比較

分解時間 min	単純液の分解速度定数 $k \times 10^{-3}/\text{min}$	混合液の分解速度定数 $k \times 10^{-3}/\text{min}$		
0	—	—	—	—
10	7.1	3.6	ここを初濃度とすれば	—
20	6.5	5.4	7.2	ここを初濃度とすれば
30	6.7	6.2	7.5	7.9

この表から認められることは、まづ濃度の低いでんぶん溶液中では高濃度でんぶん溶液中よりアミラーゼが大きい活性を示すことで、この場合にも酵素の疎水結合がその原因であろうと考えられる。

つぎに10%ゼラチンに混合されたアミラーゼがでんぶん溶液に添加される場合、はじめの20minおよび10minの分解速度はそれ以後の分解速度に比較していちぢるしく遅れているが、これはゼラチンの希釈によってアミラーゼの疎水結合が時間の経過とともに急速に回復し同時にその活性が急速に増大することを示している。

表4は $\alpha$ -アミラーゼ0.02%、ゼラチン10%の混合液を数日間室温に放置する場合、日数経過とともに液の粘度が低下してゆき同時にアミラーゼ活性がそれにもなつて次第に回復することを示すものである。

表4 アミラーゼ—ゼラチン混合液の粘度低下とアミラーゼ活性の関係

経過日数	1日	2日	3日	4日
0.02%アミラーゼの力価 (5%ブドウ糖添加)	100	100	100	100
0.02%アミラーゼ、10%ゼラチン混合液の力価	72	80	85	89
全上 混合液の比粘度	107	37	29	23
全上直流 (約10V/cm, 30min) 処理後の比粘度	74	25	20	20

このばあい液の粘度低下はアミラーゼとゼラチンの間に異種蛋白間の抱合が生じていることを示すのであろうが、一方において液の粘度低下にもなつてアミラーゼ力価が反って上昇していることから、高濃度ゼラチン中におけるアミラーゼ活性の低下はゼラチンとの抱合によるものではなくて、ゼラチンにより水のポテンシャルが低下したために酵素の疎水結合が弛緩することに起因すると推定される。

また表に示されているごとくこの混合液に直流を通じた場合にもゼラチン単純液の場合と同様さらに粘度低下をきたすことから、直流処理によるゼラチンの収縮が間接にアミラーゼの疎水結合の回復を促がし〔註. 直流が

直接アミラーゼ分子の疎水結合の収縮をひきおこすことも考えられるが、これもゼラチンの方の収縮現象がともなわれないかぎり水のポテンシャルは前と変りはないのであるから、たとえアミラーゼの疎水結合が一時的に回復したとしても電流が断たれば直ちに以前の状態にもどるであろう。], 最終的に直流によるゼラチン中のアミラーゼ活性の増大, 回復の認められることが期待されるのであるが, 次節に述べるごとくこの現象は未だ確認されるに到っていない。

なお $\alpha$ -アミラーゼ0.02%単純水溶液の力価は5%のブドウ糖を添加することにより数日間は冷蔵庫中で保持できるのでこれを対照とした。ブドウ糖を添加しない場合には空気中の酸素による酸化作用と考えられるが数日間にはかなりのアミラーゼ活性の低下が認められる。

## 6. む す び

前節に述べたごとくアミラーゼと高濃度ゼラチンの混合液を直流で処理して液の粘度が低下するばあい, 当然そこにアミラーゼ活性の回復現象が期待されるのであるが, もしこれが試験管のなかで確実に証明されれば蛋白質の疎水結合を介して直流電流による生体内の酵素, 核等の活性回復の可能性が生じ, ひいては生命体の活性復活ということが現代の物理, 化学の立場から具体性をもつようになると考える。

しかしながら先にも述べたごとく現在までのところ市販の菓子製造用の粗製板ゼラを使用した混合液についてのみ第3日目に以上の現象が2度ほど確認できただけで, 一般に局方の精製ゼラチンで再現することができない段階である。

すなわち表4の混合液の粘度と力価および直流処理後の粘度から推定されるように, 10v/cm, 30min程度の直流処理で期待されるアミラーゼの力価回復はたかだか数%程度のものであり, 実際に実験を行なってみるとそこにはゼラチンの種類, 混合液の経過日数の2つが大きなfactorであることが解る。すなわち粗製板ゼラのなかには還元性物質と思われるものを含有するのが多く, この種の実験には使用不可能なことがしばしばであった。

そのほか直流処理にあたっての技術上の問題, すなわち両極附近におけるアミラーゼの破壊をいかにして最小限に抑えるかということや, 比色計の精度の問題, さらに蛋白質分子に対する直流の効果は単に収縮を起させるだけでなくまた「振れ」をも生じさせるはづであるからこれ等の問題に対する検討等, 多くの問題が残されている。

本実験をすすめるにあたり, 御審議を戴いた九大温研八田教授ならびに医局員の方々に対して厚く感謝の意を表します。

## 参 考 文 献

- 1) 井村, 八田: 温研紀要 16: 130.(1964)
- 2) 石橋, 清山, 坂井: 電気化学 32: 534.(1964)
- 3) 山根, 出尾, 水谷: 電気化学 33: 589.(1965)
- 4) 伊勢村: 生物物理学講座4: 141吉岡書店(1965)

## Recovery on Hydrophobic - bond of Protein by Direct Current

(H. Imura & Y. Washizuka)

It would be possible to assume that the senility of living individuals comes from very minute denaturation on each protein of all kinds, that is enzyme, nucleus and membrane etc. which organize the cell.

Then it would be able to infer that each living individuals must be bound with 2nd Law and be within closed system, not the opened, as generally natural chemical phenomena obey the Law.

In aqueous solution the velocity of catalytic action by inorganic or metallic ions (e.g. by  $\text{Cu}^{++}$  to  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition) is enhanced when the concentration of  $\text{NaCl}$  in the solution is increased. This experimental result suggests that the active center in an enzyme will be activated by the protein, which occupies the most part of enzyme and has inside itself the numerous plus and minus fixed ions.

And it is suggested that in aqueous solution the fixed ions held in the protein of enzyme will make up dense electrostatic field which is resemble to the field made by all kinds of chemical ligands around metal ion.

And then, if the hydrophobic-bond of protein, especially of enzyme, would become slack by some condition or cause, it is possible to presume that the activity of the protein will diminish owing to decreasing the density of fixed ions inside the molecules.

During the research of paper electrophoresis, it happened to be found that the fraction of amino-acids contracts by direct current when the pH of the electrolyte in paper comes near to the amino-acid's isoelectric point. Standing upon this electrical phenomenon, the protein which is the same amphoteric electrolyte as amino-acids must contract itself by D.C..

Therefore in this study the effect caused by D.C. to the hydrophobic-bond of proteins was researched and discussed.

Simple gelatine solution decreases its viscosity when it is electrified by D.C., and this effect means that each gelatine molecule contracts itself as expected of abovementioned phenomenon.

The activity of  $\alpha$ -amylase diminishes when it was put into the rich gelatine solution, and the cause of which is conjectured as owing to slackening of the enzyme's hydrophobic-bond. High concentration of protein is supposed as it weakens the potential energy of aqueous molecule and becomes the cause of the slackening of amylase.

In conclusion, when the compound solution of 10% gelatine and 0.02%  $\alpha$ -amylase was electrified and the viscosity of the solution decreased as well as simple gelatine solution, the recovery of hydrophobic-bond of amylase is expected coming from the increase of aqua's potential which is accompanied with contracting of gelatine. But at the present condition the revival of  $\alpha$ -amylase by D.C. is not yet observed except only one case using one kind of coarse gelatine.